

氏名	山本 裕介
授与した学位	博士
専攻分野の名称	薬科学
学位記授与番号	博乙 第 4512 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の論文提出者 (学位規則第 4 条第 2 項該当)
学位論文の題目	ナフタレン環含有アミノ酸誘導体を用いた皮膚感作性試験代替法の低濃度および重量濃度測定法の開発とその有用性の検証
論文審査委員	教授 上田 真史 (主査) 教授 竹内 靖雄 准教授 古田 和幸

学位論文内容の要旨

近年、化学製品における安全性試験において、動物愛護の観点から従来の動物実験に対する規制が厳しくなっており、さまざまな動物を使用しない試験法 (代替法) が開発されている。

皮膚感作性試験においてもいくつかの動物実験代替法が開発されており、皮膚感作の初期段階で起こる感作性物質とタンパク質との反応を評価する試験法として Direct Peptide Reactivity Assay (DPRA) がある。この試験法はタンパク質の代わりにペプチドと化合物の反応性を評価する試験法であり、簡便で汎用性の高い方法である。しかしながら、この試験法は試験濃度が高いために被験物質が反応液中で析出するといった課題や、被験物質溶液をモル濃度で調製する必要があるために分子量が不明な化合物の評価ができないといった課題があった。一方、我々の研究施設では、過去にタンパク質の代わりに検出試薬として、高い UV 吸収を有するナフタレン環をアミノ酸のシステインおよびリジンに導入した *N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine および α -*N*-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine を用いた高感度な皮膚感作性試験代替法を開発している。そこで、本研究ではこの試験法の特徴を活かし、DPRA における上記の課題を解決した新たな試験法の開発を試みた。

まず、反応液中における被験物質の析出を回避するために、試験濃度の低濃度化を行ったところ、DPRA の試験系開発に使用された 82 化合物における *in vivo* 試験に対する予測精度が 90.2% となり、DPRA と同等以上の予測精度であることが示された。さらに、同じ 82 化合物について反応液中における析出の有無を比較したところ、DPRA では LogKow が 2 以

上の化合物においてほとんどが析出したのに対し、新たに確立した低濃度の試験法では LogKow が 6 以上の非常に疎水性の高い化合物においてしか析出は見られなかった。

次に、分子量が不明な化合物を評価可能にするために、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験法の開発を行った。その結果、0.5 mg/ml の被験物質溶液を用いた場合において、*in vivo* 試験に対する予測精度が DPRA および上記で開発した低濃度の試験法と比較して同程度であることが確認された。さらに、非感作性物質の混合液に感作性物質を添加した疑似混合液を用いた評価を行ったところ、感作性物質が 0.5 mg/ml 含まれている場合において、試験に用いた感作性物質すべてを検出することができた。

また、上記で確立した低濃度の試験法と、重量濃度で調製した被験物質溶液を用いた試験法の有用性を確認するために、複数の試験を組み合わせたアプローチにおける評価能力の検証を行った。既存の 4 種のアプローチと本研究で新たに考案した 1 種のアプローチを用いた検証の結果、DPRA を用いた場合と同程度の予測精度となり、複数試験の組合せアプローチにおいても有用であることが示された。

以上より、本研究で開発した試験法は疎水性物質や混合物を含む広範囲な化合物への適用が可能な、非常に有用な試験法であることが示されると共に、他の皮膚感作性代替法との組み合わせによる皮膚感作性評価における有用性が示された。

論文審査結果の要旨

審査結果に至った理由:口頭試問を令和 2 年 1 月 23 日 (木) に実施した。それぞれの審査員の専門分野である分析学・化学・免疫学の観点からの質問に対して、その場あるいは改訂論文中で適切な回答が得られ、学位論文の内容が申請者自身の研究成果によるものであることが確認できた。また議論の中で、「特定波長に UV 吸収を有するナフタレン環を利用した高感度分析法の開発」自体が重要な研究成果なのではなく、「その高感度分析法を用いることで、分析対象化合物の低濃度化が可能となり、析出しない条件での正確な測定(分析対象の適用拡大)や未知物質に対応した重量濃度測定法の開発が可能となった点」に新規性・進歩性があることが認められ、より精度の高い動物実験代替法の開発に貢献できる研究成果であると考えられた。学位論文のタイトルや論旨をそれに即した形で改訂するように指摘し、2 度の改訂を経て提出された学位論文の内容について、質・量ともに担保されており、申請者の研究分野の標準の形態・書式に倣っていることが確認できた。これらの理由により、「合」と判断した。